

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

01.04.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 3月29日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-095291

[ST.10/C]:

[JP2002-095291]

出 願 人

Applicant(s):

セレスター・レキシコ・サイエンス株式会社
第一製薬株式会社

REC'D 23 MAY 2003

WIPO

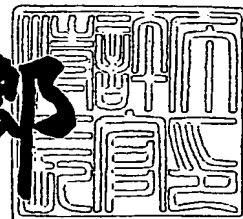
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月 9日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3033411

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02-1025

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 38/17

【発明の名称】 c-J u n リン酸化阻害剤 (B M A L 1)

【請求項の数】 17

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区中瀬 1 丁目 3 番地
 幕張テクノガーデン D 棟 1 7 階
 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社内

 【氏名】 土居 洋文

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西 1 丁目 1 6 番 1 3 号
 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内

 【氏名】 和田 直也

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西 1 丁目 1 6 番 1 3 号
 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内

 【氏名】 中島 弘人

【特許出願人】

 【識別番号】 500520628

 【氏名又は名称】 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

【特許出願人】

 【識別番号】 000002831

 【氏名又は名称】 第一製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100088904

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 庄司 隆

【電話番号】 03-3864-6572

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 c - J u n リン酸化阻害剤 (B M A L 1)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 B M A L 1 からなる c - J u n N 末端キナーゼ 3 による c - J u n のリン酸化阻害剤。

【請求項 2】 B M A L 1 の部分ペプチド、B M A L 1 のアミノ酸配列において 1 個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、または B M A L 1 と約 7 0 % 以上の相同性を有するペプチドであって、c - J u n N 末端キナーゼ 3 と相互作用するペプチドからなる c - J u n N 末端キナーゼ 3 による c - J u n のリン酸化阻害剤。

【請求項 3】 B M A L 1 を用いることを特徴とする、c - J u n N 末端キナーゼ 3 による c - J u n のリン酸化の阻害方法。

【請求項 4】 B M A L 1 の部分ペプチド、B M A L 1 のアミノ酸配列において 1 個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、または B M A L 1 と約 7 0 % 以上の相同性を有するペプチドであって、c - J u n N 末端キナーゼ 3 と相互作用するペプチドを用いることを特徴とする、c - J u n N 末端キナーゼ 3 による c - J u n のリン酸化の阻害方法。

【請求項 5】 請求項 1 または 2 に記載のリン酸化阻害剤からなる c - J u n の転写活性化能の阻害剤。

【請求項 6】 B M A L 1、または B M A L 1 の部分ペプチド若しくは B M A L 1 のアミノ酸配列において 1 個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若しくは B M A L 1 と約 7 0 % 以上の相同性を有するペプチドであって c - J u n N 末端キナーゼ 3 と相互作用するペプチド、により c - J u n N 末端キナーゼ 3 による c - J u n のリン酸化を阻害することを特徴とする、c - J u n の転写活性化能の阻害方法。

【請求項 7】 請求項 1 若しくは 2 に記載のリン酸化阻害剤、または請求項 5 に記載の転写活性化能の阻害剤を少なくとも 1 つ含有してなる医薬組成物。

【請求項 8】 請求項 7 に記載の医薬組成物からなる、c - J u n N 末端キナーゼ 3 による c - J u n のリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療

剤。

【請求項9】 BMAL1、またはBMAL1の部分ペプチド若しくはBMAL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若しくはBMAL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってc-Jun N末端キナーゼ3と相互作用するペプチド、をコードするポリヌクレオチドを含んでなる、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療剤。

【請求項10】 前記c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患が神経変性疾患である請求項8または9に記載の防止および／または治療剤。

【請求項11】 前記神経変性疾患がポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリーアルブミン病、デメンチア(familial British dementia)、クロイツフェルトーヤコブ(Creutzfeldt-Jakob)病、ゲルストマンーストランスラー(Gerstmann-Strausler)症候群、狂牛病(ウシ海綿状脳症)(BSE)、またはニューロセルピン(neuroserpin)封入体を伴う家族性痴呆症である請求項10に記載の防止および／または治療剤。

【請求項12】 BMAL1によりc-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とする、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療方法。

【請求項13】 BMAL1の部分ペプチドまたはBMAL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチドまたはBMAL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってc-Jun N末端キナーゼ3と相互作用するペプチド、によりc-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とする、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療方法。

【請求項14】 BMAL1、またはBMAL1の部分ペプチド若しくはBMAL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若しくはBMAL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってc-Jun N末端キナーゼ3と相互作用するペプチド、をコードするポリヌクレオチドを用いてBMAL1または当該ペプチドを発現せしめることにより、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とする、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療方法。

【請求項15】 請求項7に記載の医薬組成物を使用することを特徴とするc-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療方法。

【請求項16】 前記c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患が神経変性疾患である請求項12から15のいずれか1項に記載の防止および／または治療方法。

【請求項17】 前記神経変性疾患がポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリーアルプリティッシュデメンチア(familial British dementia)、クロイツフェルトーヤコブ(Creutzfeldt-Jakob)病、ゲルストマンーストランスラー(Gerstmann-Strausler)症候群、狂牛病(ウシ海綿状脳症)(BSE)、またはニューロセルピン(neuroserpin)封入体を伴う家族性痴呆症である請求項16に記載の防止および／または治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、BMAL1、またはBMAL1の部分ペプチド若しくはBMAL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若し

くはBMAL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってc-Jun N末端キナーゼ3（以下、JNK3と略称する）と相互作用するペプチド、によりJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することによるc-Junの機能抑制、例えば転写活性化能抑制、これを利用したアポトーシス抑制、例えば神経細胞のアポトーシス抑制、並びに神経変性疾患などの防止および／または治療、に用いる薬剤、医薬組成物およびその方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

c-Jun N末端キナーゼ（以下、JNKと略称する）は、MAPキナーゼスーパーファミリーの1つである。しかしながら、JNKは古典的MAPキナーゼ（ERK）とは異なり、増殖刺激ではほとんど活性化せず、細胞に対するストレス、例えばDNA損傷、紫外線、熱、高浸透圧、ERストレス、および活性酸素など並びに炎症性サイトカイン、例えば腫瘍壊死因子（TNF）やインターロイキン1など、により活性化する。

【0003】

JNKがストレス応答により活性化され、アポトーシスに関与することは、JNKの活性化が神経成長因子（NGF）除去による神経系細胞株PC12細胞の細胞死において観察されたことなどから、従来知られていた。近年、JNKがカスパーゼ（caspase）依存的なアポトーシスの調節に作用すること、またカスパーゼ非依存的にJNK依存的なアポトーシスが起こることが報告されている。さらに、哺乳類において病的（神経変性疾患）に起こる細胞死の多くが、カスパーゼ非依存的に起こることが明らかになってきた〔北中 千史ら、Molecular medicine（2000）37：408-418〕。

【0004】

アポトーシスには転写依存的な細胞死（例えば神経栄養因子除去による交感神経死やDNA損傷による死）と、転写非依存的な細胞死（例えば紫外線照射による死やFasによる死）があるが、JNKは両方への関与が示唆されている。転写依存的な細胞死では、JNKがc-Junのアミノ酸配列中第63番目および第73番目のセリン（S）をリン酸化して活性化せしめることが認められている

。例えば、c-Junのリン酸化部位をアラニン（A）に置換した変異体（A63、A73）のノックインマウスでは、カイニン酸投与による神経死が顕著に抑制された〔Behrens, A. et al., Nature Genet. (1999) 21:326-329〕。c-Junはトランスアクチベーターであり、遺伝子の発現制御部位に結合して、その遺伝子の転写を促進する転写活性化能を有する。したがって、c-Junはその下流でなんらかのアポトーシス促進因子、例えばBimおよびFasLなど、の転写を誘導すると予想されている。

【0005】

現在、哺乳類には、3種類のJNK遺伝子、すなわちJNK1、JNK2、およびJNK3、が見い出されている。このうち、JNK3は脳神経系などに特異的に発現しており、低酸素状態などのショック的状况で発現して脳機能に障害を与えることが知られている。また、JNK3をノックアウトすると、カイニン酸投与による興奮性神経死が抑制されることが報告されている〔Yang, D. D. et al., Nature (1997) 389:865-870〕。

【0006】

したがって、JNK3のシグナル経路を阻害することにより、JNK3のシグナル経路の異常によって引き起こされる疾患、例えば細胞のアポトーシスに基づく疾患、具体的には神経変性疾患など、の解明並びに防止および／または治療が可能になると考えられる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、JNK3のシグナル経路を阻害する物質を見い出し、JNK3のシグナル経路の異常によって引き起こされる疾患、例えば細胞のアポトーシスに基づく疾患、具体的には神経変性疾患など、の防止および／または治療手段を提供しようとするものである。

【0008】

【課題解決のための手段】

上記課題を解決すべく本発明者らは鋭意努力し、JNK3と相互作用する蛋白質BMA1により、JNK3によるc-Junのリン酸化が阻害されることを

見出し、本発明を完成した。

【0009】

すなわち本発明は、

- (1) BMAL1からなるJNK3によるc-Junのリン酸化阻害剤、
- (2) BMAL1の部分ペプチド、BMAL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、またはBMAL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであって、JNK3と相互作用するペプチドからなるJNK3によるc-Junのリン酸化阻害剤、
- (3) BMAL1を用いることを特徴とする、JNK3によるc-Junのリン酸化の阻害方法、
- (4) BMAL1の部分ペプチド、BMAL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、またはBMAL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであって、JNK3と相互作用するペプチドを用いることを特徴とする、JNK3によるc-Junのリン酸化の阻害方法、
- (5) 前記(1)または(2)のリン酸化阻害剤からなるc-Junの転写活性化能の阻害剤、
- (6) BMAL1、またはBMAL1の部分ペプチド若しくはBMAL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若しくはBMAL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってJNK3と相互作用するペプチド、によりJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とする、c-Junの転写活性化能の阻害方法、
- (7) 前記(1)若しくは(2)のリン酸化阻害剤、または前記(5)の転写活性化能の阻害剤を少なくとも1つ含有してなる医薬組成物、
- (8) 前記(7)の医薬組成物からなる、JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療剤、
- (9) BMAL1、またはBMAL1の部分ペプチド若しくはBMAL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若しくはBMAL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってJNK3と相互作用するペプチド、をコードするポリヌクレオチドを含んでなる、JNK3による

c-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療剤、

(10) 前記JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患が神経変性疾患である前記(8)または(9)の防止および／または治療剤、

(11) 前記神経変性疾患がポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリーアルブリティッシュデメンチア(familial British dementia)、クロイツフェルトーヤコブ(Creutzfeldt-Jakob)病、ゲルストマンーストランスラー(Gerstmann-Stransler)症候群、狂牛病(ウシ海綿状脳症)(BSE)、またはニューロセリン(neuroserpin)封入体を伴う家族性痴呆症である前記(10)の防止および／または治療剤、

(12) BMAL1によりJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することによって、JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療方法、

(13) BMAL1の部分ペプチドまたはBMAL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチドまたはBMAL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってJNK3と相互作用するペプチド、によりJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とする、JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療方法、

(14) BMAL1、またはBMAL1の部分ペプチド若しくはBMAL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若しくはBMAL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってJNK3と相互作用するペプチド、をコードするポリヌクレオチドを用いてBMAL1または当該ペプチドを発現せしめることにより、JNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とする、JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療方法、

(15) 前記(7)の医薬組成物を使用することを特徴とするJNK3による

c-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療方法、

(16) 前記JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患が神経変性疾患である前記(12)から(15)のいずれかの防止および／または治療方法、

(17) 前記神経変性疾患がポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリーアルプリティッシュデメンチア(familial British dementia)、クロイツフェルトーヤコブ(Creutzfeldt-Jakob)病、ゲルストマンーストランスラー(Gerstmann-Stransler)症候群、狂牛病(ウシ海綿状脳症)(BSE)、またはニューロセリン(neuroserpin)封入体を伴う家族性痴呆症である前記(16)の防止および／または治療方法、
からなる。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明においては、JNK3と相互作用してリン酸化されるBMAL1が、JNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを見い出した。すなわち、BMAL1がJNK3と相互作用することにより、JNK3とc-Junとの相互作用が阻害され、その結果c-Junのリン酸化が阻害されと考えられる。

【0011】

BMAL1は、国際公開第WO01/67299号公報記載の方法によりJNK3と相互作用する蛋白質であると予測され、さらに実際の実験においてJNK3によってリン酸化されることからJNK3との相互作用が確認された蛋白質である。

【0012】

BMAL1はサーカディアンリズム関連遺伝子であるPERIOD遺伝子(PER)の転写を促進する転写因子であり、CLOCK蛋白質とヘテロダイマーを形成し、PER遺伝子プロモーターに存在するE-box配列に結合する[Ge

kakis N. et al., (1998) Science 280:1564-1569] [Maureen K. B. et al., (2000) Cell 103:1009-1017]。BMAL1のアイソフォームであるMOP3のノックアウトマウスでは、サーカディアンリズムの異常が見られる。

【0013】

BMAL1は公知の蛋白質であるため、BMAL1をコードするポリヌクレオチドの情報に基づいて、公知の遺伝子工学的手法により得ることが可能である [Ikeda, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1997) 233:258-264]。例えば、上記ポリヌクレオチドの情報にしたがって設計し公知の方法で合成したプライマーを用いて、例えばヒト脳由来cDNAライブラリーを用いて目的の遺伝子を増幅し、発現ベクターに挿入して宿主細胞に導入することにより、BMAL1を発現する細胞を得ることができる。また、公知の無細胞蛋白質合成系を利用して合成することも可能である。

【0014】

一方、JNK3によるc-Junのリン酸化はアポトーシス、例えば神経細胞死に関与していることが報告されている [Behrens, A. et al., Nature Genet. (1999) 21:326-329]。また、c-Junはトランスアクチベーターであり、遺伝子の発現制御部位に結合して当該遺伝子の転写を促進する転写活性化能を有し、そのシグナル経路の下流でなんらかのアポトーシス促進因子、例えばBimおよびFasLなど、の転写を誘導すると予想されている。

【0015】

これらから、BMAL1を用いてJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することにより、c-Junの転写活性化能を抑制することができ、さらにはJNK3によるc-Junのリン酸化により引き起こされる生理的現象、例えばアポトーシスを抑制することが可能と考えられる。

【0016】

また、BMAL1の部分ペプチドであってJNK3とBMAL1とが相互作用

する部位を含むペプチドのうち JNK3 と相互作用し得るペプチドは、JNK3 と c-Jun との相互作用を阻害できるため、JNK3 による c-Jun のリン酸化阻害に利用できる。本発明において部分ペプチドとは、当該部分ペプチドを含有するペプチドのアミノ酸配列のうち少なくとも 5 個の連続したアミノ酸残基からなるペプチドのことを意味する。また、BMAL1 のアミノ酸配列において 1 個ないし数個のアミノ酸に変異、例えば置換、欠失、付加、または挿入など、を有するアミノ酸配列からなるペプチド、あるいは BMAL1 と約 70% 以上の相同性を有するペプチドであって、JNK3 と相互作用し得るペプチドも、JNK3 による c-Jun のリン酸化阻害に利用できる。上記ペプチドは、その性質として、JNK3 と BMAL1 との相互作用を阻害し得る。かかるペプチドは、BMAL1 のアミノ酸配列に基づいて設計して自体公知の方法で合成し、JNK3 と BMAL1 との相互作用、例えば BMAL1 のリン酸化、を指標にして阻害作用を確認することにより得ることができる。また、上記変異が導入されたペプチドは自体公知の手段、例えば部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法またはポリメラーゼ連鎖増幅法（PCR）を単独または適宜組み合わせ、例えばサンプブルック等編「モレキュラークローニング、ア ラボラトリーマニュアル 第 2 版」コールドスプリングハーバーラボラトリー、1989、村松正實編「ラボマニュアル遺伝子工学」丸善株式会社、1988、エールリッヒ、H.E. 編「PCR テクノロジー、DNA 増幅の原理と応用」ストックトンプレス、1989 等の成書に記載の方法に準じて、あるいはそれらの方法を改変して利用することにより得ることができる。例えば Ulmer の技術（Science, 219, 666, 1983）を利用することができる。このような変異の導入において、当該ペプチドの基本的な性質（物性、活性、または免疫学的活性等）を変化させないという観点からは、例えば、同族アミノ酸（極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸等）の間での相互置換は容易に想定される。

【0017】

ここでペプチドとは、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している 2 個またはそれ以上のアミノ酸を意味し、オリゴペプチド、ポリ

ペプチド、蛋白質を包含する。以降、アミノ酸を表記する場合、1文字にて表記することがある。

【0018】

上記発見に基づいて、本発明において、BMAL1、またはBMAL1の部分ペプチド若しくはBMAL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若しくはBMAL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってJNK3と相互作用するペプチドからなるc-Junのリン酸化阻害剤、当該リン酸化阻害剤からなるc-Junの転写活性化能の阻害剤、当該リン酸化阻害剤または当該転写活性化能の阻害剤を少なくとも1つ含有してなる医薬組成物、BMAL1または上記ペプチドを用いることを特徴とするJNK3によるc-Junのリン酸化の阻害方法、並びにBMAL1または上記ペプチドを用いることによりJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とするc-Junの転写活性化能の阻害方法が提供可能である。これらは、JNKのシグナル経路およびその機能を解明するための試薬として有用である。

【0019】

本明細書において、c-Junの転写活性化能の阻害剤とは、c-Junの特定DNA配列への結合、c-Junと協同して転写を行う他因子との結合など、c-Junを含む転写活性装置になんらかの形で作用することにより、最終的にc-Junが関与する転写活性を阻害するものを意味する。

【0020】

JNKシグナル経路が、ポリグルタミン病による細胞死のモデル系においてポリグルタミンを含む凝集体の中で活性化していること、またポリグルタミンによる細胞死をMKK4（JNKシグナルにおいてJNKの上流に位置し、JNKをリン酸化して活性化せしめるMAPキナーゼキナーゼ4）やc-Junのドミナントネガティブ変異体が抑制することが報告されている〔Yasuda, S. et al., Genes to Cells (1999) 4: 734-756〕。さらに、アルツハイマー病の原因遺伝子アミロイド・プレカーサー・プロテイン（APP）の切断産物アミロイドβによる細胞死にJNKが関与することも示

されている〔浦 誠司ら、実験医学（2001）19：1839-1844〕。

【0021】

これらから、BMAL1、またはBMAL1の部分ペプチド若しくはBMAL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若しくはBMAL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってJNK3と相互作用するペプチド、を用いてJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することにより、JNK3によるc-Junのリン酸化に係るアポトーシスに基づく疾患、例えば神経変性疾患など、の解明並びに防止および／または治療が可能になると考えられる。神経変性疾患としては、次に挙げる例に限定されるものではないが、ポリグルタミン病（例えばハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、および歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症など）、並びにアルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリーアルブリティッシュデメンチア（familial British dementia）、クロイツフェルトーヤコブ（Creutzfeldt-Jakob）病、ゲルストマンーストランスラー（Gerstmann-Straussler）症候群、狂牛病（ウシ海綿状脳症）（BSE）、およびニューロセリン（neuroserpin）封入体を伴う家族性痴呆症などが挙げられる。上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、または上記医薬組成物は、上記疾患の防止および／または治療剤、並びにこれらを用いることを特徴とする上記疾患の防止および／または治療方法に使用できる。

【0022】

また、蛋白質発現用のベクターやトランスポーターを用いて、BMAL1、またはBMAL1の部分ペプチド若しくはBMAL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若しくはBMAL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってJNK3と相互作用するペプチド、をコードするポリヌクレオチドをインビボで発現させてJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害し、上記疾患を防止および／または治療することも可能である。BMAL1または上記ペプチドのインビボでの発現は、公知の方法を利用して実施

できる。例えばBMA L 1または上記ペプチドをコードするポリヌクレオチドを処理加工して、核酸ベクター、例えば複製欠損レトロウイルスベクターなど、に挿入して対象の細胞中に送達することにより可能である。したがって、BMA L 1または上記ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる、JNK 3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療剤も本発明の範囲に含まれる。

【0023】

上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、上記医薬組成物、または上記防止および／若しくは治療剤の処方および投与形態は、適当な医薬担体と組み合わせる処方が好ましい。かかる処方、治療上有効量の上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、上記医薬組成物、または上記防止および／若しくは治療剤、さらに医薬上許容される担体または賦形剤を含む。かかる担体としては、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびそれらの混合物が挙げられるが、これらに限らない。処方、投与経路に適したものを選択すればよく、該処方は当業に知られている。

【0024】

上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、上記医薬組成物、または上記防止および／若しくは治療剤の処方および投与形態は、単独で使用してもよく、あるいは治療に必要な他の化合物と一緒に使用してもよい。上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、上記医薬組成物、または上記防止および／若しくは治療剤の全身投与の好ましい一態様は、注射、例えば静脈注射が挙げられる。皮下、筋肉内または腹腔内のような他の注射経路を用いることもできる。投与の別の態様は、腸溶処方またはカプセル処方がうまく処方されるならば、経口投与も可能である。さらに、胆汁酸塩またはフシジン酸または他の界面活性剤のような浸透剤を用いる経粘膜または経皮投与を用いることもできる。投与は局所的なものであってもよく、膏薬、パスタ、ゲルなどの形態での投与であってもよい。

【0025】

必要な用量範囲は、上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、上記医薬組成物、または上記防止および／若しくは治療剤の有効性、投与経路、処方性の性質、対象の症状の性質、および担当医師の判断による。具体的には、適当な用量は、例えば対象の体重1kgあたり0.1ないし100μgの範囲である。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。

【0026】

製剤化にあたっては蛋白質など各対象の物性に応じた公知の製剤化手段を導入すればよい。具体的には例えば、散剤、丸剤、錠剤、カプセル製剤、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、リポソーム製剤、脂肪乳剤、シクロデキストリンなどの包接体などの製剤化方法が利用できる。

【0027】

散剤、丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクトース、グルコース、シュクロース、マンニトールなどの賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダなどの崩壊剤、マグネシウムステアレート、タルクなどの滑剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを用いて製造できる。錠剤やカプセルを製造するには、固体の製薬担体を用いられる。

【0028】

懸濁剤は、水、シュクロース、ソルビトール、フラクトースなどの糖類、PEGなどのグリコール類、油類を使用して製造できる。

【0029】

注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液または、塩水とグルコース溶液の混合物からなる担体を用いて調製可能である。

【0030】

リポソーム化は例えば、リン脂質を有機溶媒（クロロホルムなど）に溶解した溶液に、当該物質を溶媒（エタノールなど）に溶解した溶液を加えた後、溶媒を留去し、これにリン酸緩衝液を加え、振盪、超音波処理および遠心分離した後、上清を濾過処理して回収することにより行い得る。

【0031】

脂肪乳剤化は例えば、当該物質、油成分（大豆油、ゴマ油、オリーブ油などの植物油、MCTなど）、乳化剤（リン脂質など）などを混合、加熱して溶液とした後に、必要量の水を加え、乳化機（ホモジナイザー、例えば、高圧噴射型、超音波型など）を用いて、乳化・均質化処理して行い得る。また、これを凍結乾燥化することも可能である。なお、脂肪乳剤化するとき、乳化助剤を添加してもよく、乳化助剤としては、例えば、グリセリン、糖類（例えば、ブドウ糖、ソルビトール、果糖など）が例示される。

【0032】

シクロデキストリン包接化は例えば、当該物質を溶媒（エタノールなど）に溶解した溶液に、シクロデキストリンを水などに加温溶解した溶液を加えた後、冷却して析出した沈殿を濾過し、滅菌乾燥することにより行い得る。この際、使用されるシクロデキストリンは、当該物質の大きさに応じて、空隙直径の異なるシクロデキストリン（ α 、 β 、 γ 型）を適宜選択すればよい。

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

【実施例1】

（JNK3と相互作用する蛋白質のインシリコでの探索）

JNK3と相互作用する蛋白質を、国際公開第W001/67299号公報に記載の予測方法にしたがってインシリコで予測した。すなわち、JNK3のアミノ酸配列をある長さのオリゴペプチドに分解し、各オリゴペプチドのアミノ酸配列あるいはそのアミノ酸配列と相同なアミノ酸配列を持った蛋白質をデータベース中で検索し、得られた蛋白質とJNK3との間でローカルアライメントを行い、ローカルアライメントのスコアの高いものをJNK3と相互作用すると予測した。ここではローカルアライメントのスコアを、国際公開第W001/67299号公報に記載の方法と同様に、25.0以上とした。また、JNK3は脳神経系に特異的に発現する蛋白質であり、低酸素状態などのショック的状况で発現し

脳機能に障害を与えることが分かっているので、JNK3と相互作用する蛋白質の候補は、脳で発現し重要な機能を持っている既知の蛋白質に絞った。

【0034】

この結果、JNK3由来の6アミノ酸残基からなるオリゴペプチドKVIEQLと相溶性あるオリゴペプチドKVKEQLが、サーカディアンリズムに関連する蛋白質BMAL1のアミノ酸配列中に存在することが分かった。また、BMAL1と相同な蛋白質BMAL2のアミノ酸配列中にもオリゴペプチドKVKEQLが存在することが分かった。図1および図2に、それぞれJNK3とBMAL1およびJNK3とBMAL2とのローカルアライメントの結果を示した。ローカルアライメントにおいて25.0以上のスコアを示すフラグメントは、JNK3とBMAL1との間で7個、JNK3とBMAL2との間で4個見いだされた。この結果から、JNK3はBMAL2よりもBMAL1に強く相互作用する蛋白質であると予測された。

【0035】

(JNK3によるc-Junのリン酸化に対するBMAL1の作用解析)

<材料>

活性化型ヒトJNK3は、N末端ヒスチジンタグ(His-tag)付加蛋白質(His-JNK3)として調製した。まず、ヒト海馬cDNAライブラリーを鋳型として逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)により得たヒトJNK3(JNK3 α 1)cDNAを、pFASTBAC HT(Invitrogen社)に挿入し、添付の説明書に従い、His-JNK3発現用組換えバキュロウイルスを作製した。次に、作製した組換えウイルスをSf9細胞に感染させてHis-JNK3を発現させ、プロボンドレジン(Probond Resin)(Invitrogen社)で精製して使用した。

【0036】

c-Jun(1-79)(c-JunのN末端79アミノ酸領域であり、JNKによるリン酸化部位を含む)は、N末端グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)融合蛋白質[以下、GST-c-Jun(1-79)]として大腸菌にて発現後、グルタチオン セファロース 4B(Glutathione

sepharose 4B) (Amersham Pharmacia biotech社) で精製して使用した。

【0037】

ヒトBMAL1は、N末端GST融合蛋白質(以下、GST-BMAL1)として大腸菌にて発現後、Glutathione sepharose 4B (Amersham Pharmacia biotech社) で精製して使用した。すなわち、まず、C末端V5/His-tag付加ヒトBMAL1発現プラスミド、pCDNA3.1-BMAL1/V5-His (Invitrogen社) からBMAL1のオープンリーディングフレーム(ORF)領域をPCRにより増幅後、pGEX-4T (Amersham Pharmacia biotech社) に挿入し、大腸菌(E. coli)用GST-BMAL1発現ベクターを構築した。

【0038】

次に、上記発現ベクターを導入したE. coli BL21株を100 μ g/mlのアンピシリンを含むLB培地中にて37℃で培養後、イソプロピル- β -D-ガラクトシド(IPTG)を終濃度0.3 mMとなるように添加し、さらに25℃で培養後、菌体を回収した。この菌体から、プロテアーゼ阻害剤カクテルを含むTGEDSバッファー[50 mM Tris-HCl, pH 8.0/0.2 mM EDTA/1 mM ジチオスレイトール(DTT)/150 mM NaCl/10% グリセロール(glycerol)]を用いて、抽出液を調製し、Glutathione sepharose 4BによりGST-BMAL1を精製した。精製したGST-BMAL1はTGEDSバッファー/0.1% Triton X-100で透析後に使用した。

【0039】

<インビトロ リン酸化実験(In vitro kinase assay)>

1 μ gの上記各GST融合蛋白質[GST-BMAL1、GST-c-Jun (1-79)またはGST]と活性化型JNK3 (70 ng)を、5 μ Ciの[γ - 32 P]ATP (アデノシン三リン酸) (3000 Ci/mmol、NEN

社)を含むカイネーションバッファー (kination buffer) (2 mM Tris-HCl, pH 7.5 / 5 mM β -glycerophosphate / 2 mM DTT / 0.1 mM Na_3VO_4 / 10 mM MgCl_2 / 10 μM ATP) 中にて、30℃で30分間インキュベーションすることにより、リン酸化反応を行った。反応後、等量の2×SDS サンプルバッファー [4% SDS / 125 mM Tris-HCl, pH 6.8 / 20% glycerol / 0.01% ブロムフェノールブルー (BPB) / 10% β -メルカプトエタノール (mercaptoethanol)] を加え、100℃で5分間処理した後、5-20% SDS-PAGEにより蛋白質を分離し、BAS2000 (Fuji film社) を用いたオートラジオグラフィーによりリン酸化蛋白質を検出した (図3のB)。また、用いた各GST融合蛋白質 (1 μg) を5-20% SDS-PAGEにより分離後、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色を行うことにより、目的蛋白質の移動度を確認した (図3のA)。なお、GST-BMAL1リン酸化反応におけるJNK3の用量依存性を確認する場合は、反応系に加える活性化型JNK3量を0 ng、14 ng、28 ngおよび70 ngとし、以下同様の方法にてリン酸化蛋白質を検出した (図4)。

【0040】

次に、1 μg のGST-c-Jun (1-79) と活性化型JNK3 (70 ng) を、GSTまたはGST-BMAL1 (共に1 μg または2 μg) の存在下若しくは非存在下で、100 μM のATPを含むカイネーションバッファー中にて、30℃で20分間インキュベーションすることによりリン酸化反応を行った。反応後、上記同様にサンプルバッファーで処理し、上清を10% SDS-PAGEにより分離し、1次抗体として抗リン酸化c-Jun抗体 (anti-Phospho-c-Jun antibody) (New England Biolabs社) を、2次抗体としてホースラディッシュ・パーオキシダーゼ結合抗ウサギIgG抗体 (HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody) (Amersham pharmacia biotech社) を用いたイムノブロッティングによりリン酸化されたGST-c

-Jun (1-79) を検出した (図5)。検出にはECLウエスタンブロッティング・ディテクション・キット (Amersham pharmacia biotech社) を使用した。さらに、検出されたリン酸化GST-c-Jun (1-79) のバンド強度を画像解析ソフト、Intelligent Quantifier (Bio Image社) を用いて定量し、GSTまたはGST-BMAL1存在下でのバンド強度を、非存在下での強度を100%としたときの相対強度で示した (表1)。

【0041】

<結果>

図3のBに示したように、JNK3によるGST-c-Jun (1-79) のリン酸化が認められた。一方、陰性コントロールであるGSTにおいてはリン酸化が認められなかったことから、本実施例で用いた実験系がJNK3の活性を測定する上で妥当であることが確認された。この実験系において、JNK3によるGST-BMAL1のリン酸化が認められた。また、このリン酸化がJNK3の用量依存的であったことから、GST-BMAL1のリン酸化は自己リン酸化ではなくJNK3によるものであることが明らかになった (図4)。これらから、JNK3とBMAL1とが相互作用することが判明した。

【0042】

また、図5および表1に示したように、1 μ gまたは2 μ gのGST-BMAL1の存在下では、JNK3によるGST-c-Jun (1-79) のリン酸化がそれぞれ約5%または約15%にまで低減した。一方、GST存在下ではJNK3によるGST-c-Jun (1-79) のリン酸化に変化はなかった。これらから、JNK3によるGST-c-Jun (1-79) のリン酸化がBMAL1により阻害されることが明らかになった。

【0043】

【表 1】

添加した蛋白質	添加量 (μ g)	相対強度 (%)
なし		100
GST	1.0	92.7
	2.0	93.6
GST-BMAL1	1.0	15.3
	2.0	4.7

【0044】

【発明の効果】

本発明においては、JNK3と相互作用してリン酸化される蛋白質BMAL1によって、JNK3によるc-Junのリン酸化が阻害されることを初めて見出した。c-Junはトランスアクチベーターであり転写活性化能を有することが知られている。また、神経細胞死が認められる疾患、例えばポリグルタミン病やアルツハイマー病、においてJNK3の関与が認められている。したがって、BPL1を用いてJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することにより、c-Junの転写活性化能を抑制することができ、さらにはJNK3によるc-Junのリン酸化により引き起こされる生理的現象、例えばアポトーシスを抑制することが可能と考えられる。

これらのことから本発明は、BMAL1、またはBMAL1の部分ペプチド若しくはBMAL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若しくはBMAL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってJNK3と相互作用するペプチド、によりJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とするc-Junの機能抑制、例えば転写活性化能抑制、これを利用したアポトーシス抑制、例えば神経細胞のアポトーシス抑制、並

びに神経変性疾患など、例えばポリグルタミン病やアルツハイマー病など、の防止および／または治療、に用いる薬剤、医薬組成物およびその方法を提供可能であり、また JNK シグナル経路およびその機能の研究のために非常に有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 JNK3とBMAL1との相互作用をインシリコで予測した結果を示す図面である。

【図2】 JNK3とBMAL2との相互作用をインシリコで予測した結果を示す図面である。

【図3】 JNK3によりBMAL1がインビトロでリン酸化されたことを示す図面である。A図は、各精製GST融合蛋白質〔レーン1：GST-BMAL1、レーン2：GST、レーン3：GST-c-Jun (1-79)〕のSDS-PAGEで泳動された位置をCBB染色により確認した結果を示す（矢頭）。レーンMは分子量マーカである。図の左側に示した数値は分子量を示す。B図は、JNK3により、GST-BMAL1（レーン1）またはGST-c-Jun (1-79)（レーン3）がリン酸化されるがGST（レーン2）はリン酸化されないことを示す。矢頭はリン酸化されたGST-BMAL1およびGST-c-Jun (1-79)を示す。

【図4】 BMAL1リン酸化におけるJNK3の用量依存性を示す図面である。レーン1、レーン2、レーン3、およびレーン4はそれぞれ、BMAL1単独、JNK3を14 ng、28 ng、70 ng用いた結果を示す。矢頭はリン酸化されたGST-BMAL1を示す。図の左側に示した数値は分子量マーカの分子量である。

【図5】 JNK3によるc-Junのリン酸化をBMAL1が阻害することを示す図面である。レーン1および4は、JNK3によるc-Jun (1-79)のリン酸化反応に他の蛋白質を無添加のとき、レーン2および3はGSTをそれぞれ1 μ gおよび2 μ g、レーン5および6はGST-BMAL1をそれぞれ1 μ gおよび2 μ g添加したときの結果を示す。矢頭はリン酸化されたc-Jun (1-79)を示す。

【書類名】 図面

【図 1】

>Score = 28.2

40 SKSKVDNQFYSEVGDSTFTVLK
352 TREKITTNCYKFKIKDGSFITLR
K Y D F L

>Score = 28.0

53 VGDSTFTVLKRYQN
129 VSESVFKILNYSQN
V S F L QN

>Score = 28.8

277 EQLGTPCPEF
324 ELLGTSCYEY
E LGT C E

>Score = 26.1

437 SSMSTDQTLASDTSSLEASAG
548 SSPSNDEAAMAVIMSLLEADAG
SS S D S LEA AG

>Score = 25.6

199 SDCTLKILDF
130 SESVFKILNY
S KIL

>Score = 26.1

268 YIDQWNKVIE
380 FMNPWTKEVE
W K E

>Score = 25.2

410 VKGQPSPSGAA
161 VKEQLSSSDTA
VK Q S S A

【図 2】

>Score = 31.4

402 EEKTKNGVVKGPSPSGAAVNSSES LPPSS
503 DDSSPTGLMKDTHTVNCRSMSNKELFPPSPS
G K E PPS S

>Score = 28.8

277 EQLGTPCPEF
364 ELLGTSCYEY
E LGT C E

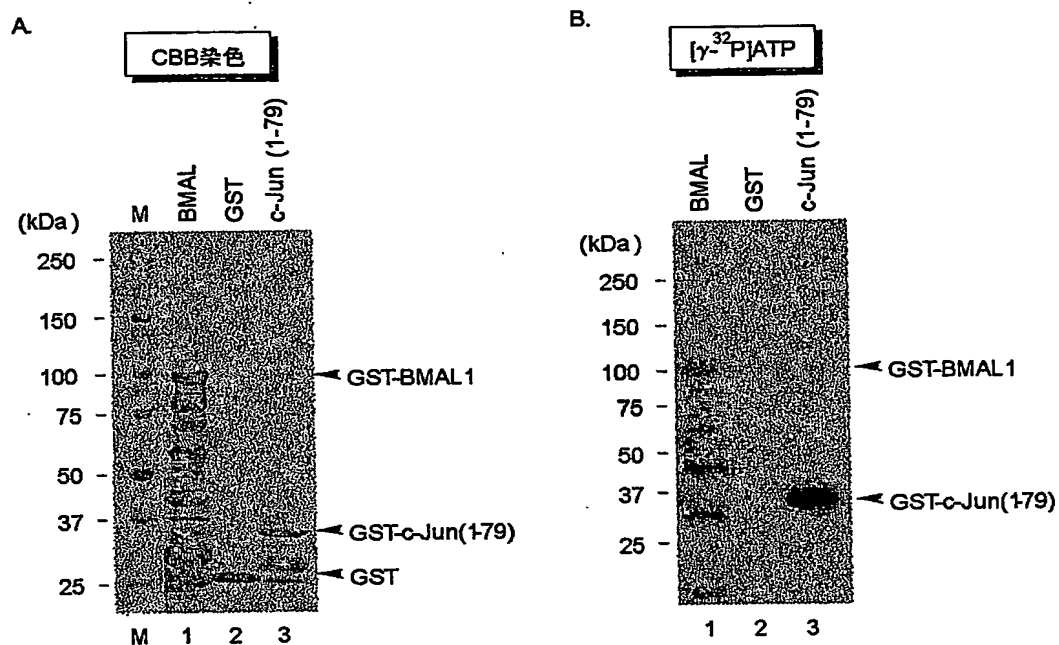
>Score = 27.0

40 SKSKVDNQFY SVEVG DSTFTVLK
392 SKEKILTDSYKFRAKDGSFVTLK
SK K Y D F LK

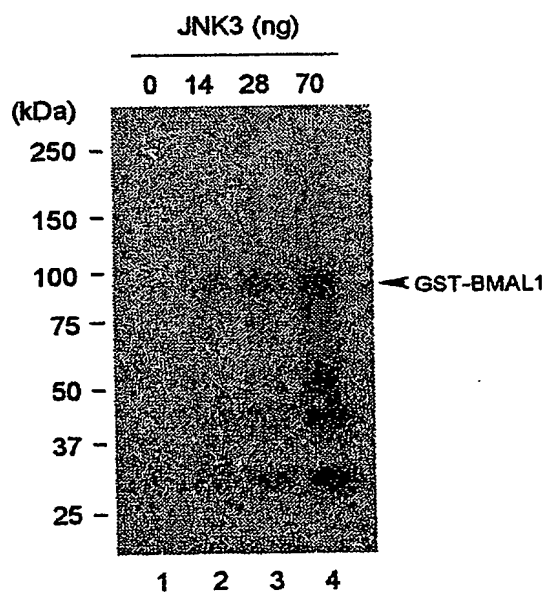
>Score = 25.4

40 SKSKVDNQFY SV
269 SKKKEHRKFYTI
SK K FY

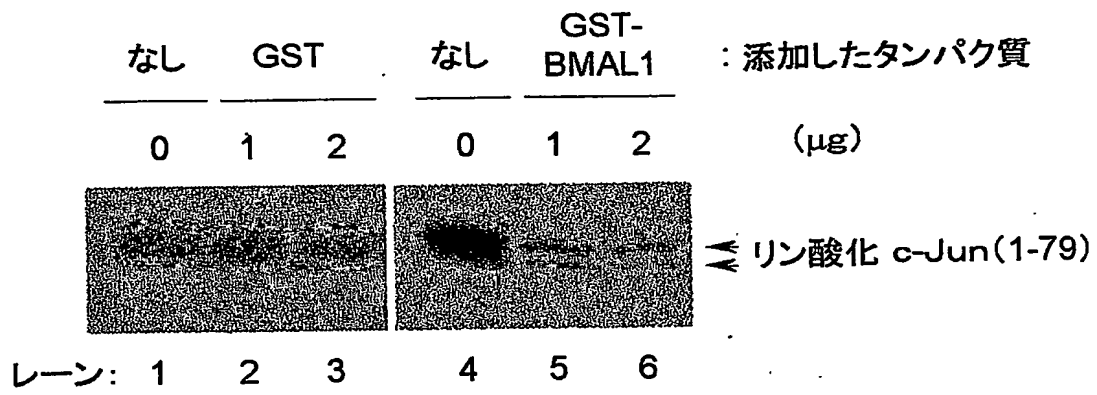
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 JNK3シグナル経路の阻害物質を見出し、JNK3シグナル経路の異常に基づく疾患、例えば細胞のアポトーシスに基づく神経変性疾患などの疾患、の防止および／または治療手段を提供すること。

【解決手段】 BMAL1、またはBMAL1の部分ペプチド若しくはBMAL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若しくはBMAL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってJNK3と相互作用するペプチドによりJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とするc-Junの機能抑制、例えば転写活性化能抑制、これを利用したアポトーシス抑制、例えば神経細胞のアポトーシス抑制、並びに神経変性疾患など、例えばポリグルタミン病やアルツハイマー病などの防止および／または治療、に用いる薬剤、医薬組成物およびその方法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-095291	
受付番号	50200456718	
書類名	特許願	
担当官	第五担当上席	0094
作成日	平成14年 4月 1日	

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 3月29日
-------	-------------

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-095291
受付番号	50200456718
書類名	特許願
担当官	鎌田 征規 8045
作成日	平成15年 4月 8日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 3月29日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [500520628]

1. 変更年月日 2000年10月26日

[変更理由] 新規登録

住 所 千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目3番地 幕張テクノガーデンD
17

氏 名 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002831]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋3丁目14番10号

氏 名 第一製薬株式会社